

氏名(本籍)	小池 悟志 (群馬県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第 6503 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	<b>GABA アミノ基転移酵素に着目したトマト果実における GABA 代謝機構の解明</b>
主査	筑波大学教授 博士(農学) 江面 浩
副査	筑波大学教授 理学博士 藤村 達人
副査	筑波大学准教授 博士(農学) 松倉 千昭
副査	筑波大学准教授 博士(理学) 菅谷 純子

### 論文の内容の要旨

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は非タンパク質構成アミノ酸の一つであり、微生物、動物および植物に広く存在している。GABA はグルタミン酸を基質とし、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) により合成された後、GABA アミノ基転移酵素 (GABA-T) によりコハク酸セミアルデヒド (SSA) へと代謝される。SSA は SSA 脱水素酵素 (SSADH) によりコハク酸に代謝された後、トリカルボン酸 (TCA) 回路へと流入する。この 3 つの酵素より構成される回路は GABA shunt と呼ばれ、TCA 回路のバイパス的な働きをしていると考えられている。GABA-T はアミノ基受容体の異なるピルビン酸依存型 (GABA-TP) と  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存型 (GABA-TK) の 2 種類が存在し、動物では GABA-TK が、植物では GABA-TP が主要な働きをしていると考えられている。

近年 GABA は機能性成分として注目されており、申請者の所属研究室では GABA を高含有する蔬菜園芸作物であるトマトに着目し、GABA 高含有品種の作出を目的として研究を進めてきた。トマトは開花直後から果実に GABA が高蓄積し緑熟期に最大に達した後、ブレイカーを転機にその GABA 含量が劇的に減少する。GABA のこのダイナミックな蓄積変動はトマトに共通しておこる現象であると推察されるが、その代謝機構の全容は明らかにされていない。特に GABA-T についてはどちらのタイプが重要であるか議論が分かれており、GABA 高含有品種作出を目指す上で大きな課題になると考えられた。そこで本研究では、GABA-T に着目しトマト果実における GABA 代謝機構を明らかにすることを目的として解析を進めた。

トマトモデル品種である 'Micro-Tom' と GABA 高含有品種 'DG03-9' の GABA 代謝関連酵素の活性を比較した結果、'Micro-Tom' における GABA-TK の活性はブレイカーを境に急激に上昇したのに対し、'DG03-9' では果実発達段階を通じ大きな変動は見られなかった。この GABA-TK 活性の変動と両品種の GABA 蓄積傾向には強い負の相関が認められた。この結果から、植物ではマイナーと考えられていた GABA-TK が GABA 代謝の鍵酵素である可能性が示唆された。

上記の結果より、トマト果実における GABA 蓄積制御機構を明らかにするためには GABA-TK の解析が必須であると考えられた。しかし、現在植物で単離されているのは GABA-TP だけである。そこで、植物で初となる GABA-TK 遺伝子の単離を目的に、3 つの GABA-TK 候補タンパク質の過剰発現体を作成して酵素活

性を解析した。しかし、何れの候補遺伝子においても過剰発現による遺伝子発現上昇が見られたにもかかわらず酵素活性に変化が見られなかった。また、精製した GABA-TK 候補タンパク質に GABA-TK 活性が確認されなかったことから、今回単離した遺伝子は GABA-TK ではないという結論に達した。

そこで、もう一つの GABA 分解酵素である GABA-TP に改めて注目し、恒常的発現を促す 35S プロモーターおよび果実特異的発現を示す E8 プロモーターの 2 つを用いて GABA-TP 遺伝子である *SIGABA-T1* ~ 3 の特異的領域を対象とした遺伝子発現抑制個体を RNA interference (RNAi) 法により作製した。その結果、35S プロモーターを用いた系統では異常な表現型を示し、草姿の矮化や不稔性が確認された。35S プロモーターを用いた系統における GABA 含量を調査した結果、赤熟果において野生型と比較して 5 倍から 9 倍の GABA を蓄積することが確認できた。これらの系統における GABA-TP の遺伝子発現を確認したところ、*SIGABA-T1* の発現が強く抑制されていることが明らかとなった。E8 プロモーターを用いた系統についても解析したところ、野生型と比較して 2 倍から 3 倍の GABA 蓄積が確認され、35S プロモーターの系統と同様に *SIGABA-T1* の発現が強く抑制されていた。

本研究によってトマト果実における GABA 代謝に GABA-TP が重要であることが実証された。また、応用面での成果として、GABA 高蓄積品種 'DG03-9' の特性解析を行い、同品種の商品化に大きく貢献した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位論文では、トマト果実に高濃度に蓄積する機能性物質・GABA の代謝に、GABA-TK ではなく、GABA-TP が重要であることを生化学的、分子生物学的に証明した。従来から植物では GABA-TK および GABA-TP の活性が確認されており、植物の GABA 蓄積に何れが重要かの議論が申請者らも含めて長い間展開されてきた。本研究により GABA-TP が GABA 蓄積に主要な役割をしていることを実験的に証明し、この長年の議論に決着をつけたことになり、学術研究として極めて意義のある研究であると判断された。さらに、本研究で解析を行い、GABA 高蓄積機構を明らかにしたトマト育種素材を活用した GABA 高含有品種の開発も行われており、技術開発としても重要な貢献をした研究であると判断された。

平成 25 年 1 月 21 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。